



PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **10132817 A**(43) Date of publication of application: **22.05.98**

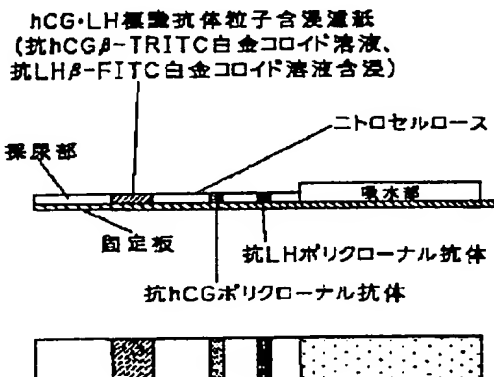
(51) Int. Cl.

G01N 33/532**G01N 33/53****// G01N 33/543**(21) Application number: **08291435**(22) Date of filing: **01.11.96**(71) Applicant: **MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD**(72) Inventor: **NAKAYAMA HIROSHI
MIYAZAKI KIMIMASA****(54) LABELED ANTIBODY PARTICLE AND
MEASURING APPARATUS USING IT****(57) Abstract**

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain a measuring method in which a judgment degree can be enhanced by using a method wherein a dye which bonds a particle material is changed arbitrarily so as to be bonded to the antibody and their bonded substance is bonded to particles or by using a method in which an arbitrary dye is bonded.

SOLUTION: A measuring principle which can make use of labeled antibody particles to the full is an immunochromatographic method. When the labeled antibody particles are introduced to the immunochromatographic method, more objects to be measured can be measured. In the immunochromatographic method which introduces a sandwich method, two kinds of antibodies which can be bonded simultaneously to an object to be measured are required. One antibody is used as a labeled mobile phase, and the other antibody is fixed to a carrier so as to be used as a stationary phase. A sheet of filter paper which is impregnated with the labeled antibody particles is mounted and bonded on the upstream side of an antibody fixation part, a sample solution which contains the object to be measured is added from the upstream side, and the particles and the object flow while they are reacting by the chromatographic method. When the particles reach the fixation part via the object, they are stopped in a sandwiched state. As a result, the antibody fixation part is colored.

COPYRIGHT: (C)1998,JPO



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平10-132817

(43) 公開日 平成10年(1998) 5月22日

(51) Int.Cl.⁶

識別記号

F I

G 0 1 N 33/532
33/53

G 0 1 N 33/532
33/53

A
C
B

// G 0 1 N 33/543

5 4 1

33/543

5 4 1 Z

審査請求 未請求 請求項の数18 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号

特願平8-291435

(22) 出願日

平成8年(1996)11月1日

(71) 出願人 000005821

松下電器産業株式会社

大阪府門真市大字門真1006番地

(72) 発明者 中山 浩

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(72) 発明者 宮崎 仁誠

大阪府門真市大字門真1006番地 松下電器
産業株式会社内

(74) 代理人 弁理士 滝本 智之 (外1名)

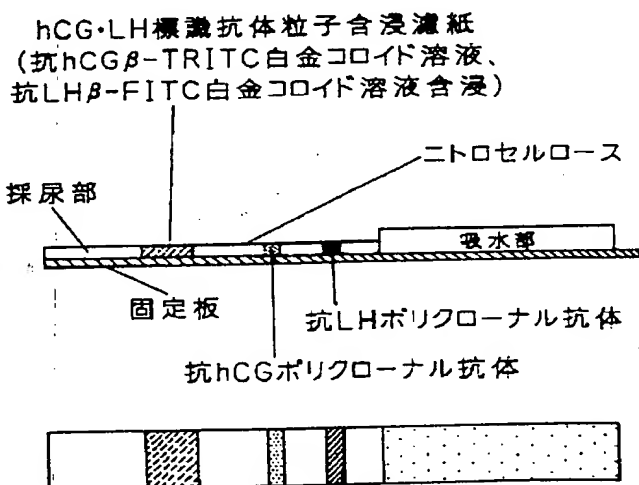
(54) 【発明の名称】 標識抗体粒子及びそれを用いた測定装置

(57) 【要約】

【課題】 粒子に結合した抗体のアビディティを失うことなく、任意の色を持った標識抗体粒子を用いて高い判定能力を有する測定装置を提供する。また、2種類以上の上記標識抗体粒子を用いて2種類以上の測定対象物を同時に測定可能な測定装置を提供する。

【解決手段】 抗体に粒子状でない標識物を標識した後、粒子に結合することを特徴とする標識抗体粒子作製方法、あるいは抗体に粒子を結合した後、粒子状でない標識物を粒子結合抗体に標識することを特徴とする標識抗体粒子作製方法を利用して粒子状でない標識物を標識した抗体を粒子に結合させたことを特徴とする標識抗体粒子を作製する。また、このようにして作製した標識抗体粒子を利用して単独あるいは多種の測定対象物を測定できる装置を作製した。

hCG・LH測定キット構成図



【特許請求の範囲】

【請求項1】 粒子状でない標識物を標識した抗体を粒子に結合させたことを特徴とする標識抗体粒子。

【請求項2】 抗体に粒子状でない標識物を標識した後、粒子に結合することを特徴とする標識抗体粒子作製方法。

【請求項3】 抗体に粒子を結合した後、粒子状でない標識物を粒子結合抗体で標識することを特徴とする標識抗体粒子作製方法。

【請求項4】 粒子が、金属、酸化物、半導体、有機物あるいはそれらの混合物であることを特徴とする請求項1記載の標識抗体粒子。

【請求項5】 粒子が、無色透明あるいはそれに著しく近い状態あるいは白色であることを特徴とする請求項1記載の標識抗体粒子。

【請求項6】 粒子状でない標識物が色素、蛍光色素、発光色素、電気化学的ラベル化剤であることを特徴とする請求項1記載の標識抗体粒子。

【請求項7】 抗体が、生体内物質、細菌、ウイルス、医薬品あるいは乱用薬物に対して結合することができるモノクローナル抗体、ポリクローナル抗体あるいは抗血清であることを特徴とする標識抗体粒子。

【請求項8】 請求項7記載の生体内物質が、タンパク質、脂質、糖類あるいは核酸類であることを特徴とする請求項1記載の標識抗体粒子。

【請求項9】 タンパク質が、ホルモンであることを特徴とする請求項8記載の標識抗体粒子。

【請求項10】 ホルモンが、絨毛性腺刺激ホルモン、甲状腺刺激ホルモン、黄体ホルモン、濾胞形成ホルモン、副甲状腺刺激ホルモン、副腎脂質刺激ホルモンであることを特徴とする請求項9記載の標識抗体粒子。

【請求項11】 請求項1、3～10のいずれかに記載の標識抗体粒子を使用することを特徴とする定性・定量的測定装置。

【請求項12】 定性的あるいは定量的測定装置が、免疫クロマトグラフィ法、凝集法、電気化学的手法あるいは分光学的手法であることを特徴とする請求項11記載の定性・定量的測定装置。

【請求項13】 定性的あるいは定量的測定装置の測定対象物が、内分泌系ホルモンであることを特徴とする請求項11記載の定性・定量的測定装置。

【請求項14】 内分泌系ホルモンが、絨毛性腺刺激ホルモン(hCG)、黄体ホルモン(LH)、甲状腺刺激ホルモンあるいは濾胞形成ホルモンであることを特徴とする請求項13記載の定性・定量的測定装置。

【請求項15】 請求項1、3～10のいずれかに記載の標識抗体粒子を使用することを特徴とする定性的あるいは定量的測定方法。

【請求項16】 定性的あるいは定量的測定方法が、免疫クロマトグラフィ法、凝集法、電気化学的手法ある

は分光学的手法であることを特徴とする請求項15記載の定性・定量的測定方法。

【請求項17】 hCGあるいはLH測定において、そのhCGあるいはLHに特異的に結合する2種類の抗体を用いて免疫クロマトグラフィ及びサンドイッチ法を利用し、移動相として請求項1記載の標識抗体粒子を用い、固定相としても一方の抗体を白色の担体に固定化し、hCGあるいはLHを含む試料を展開することにより固定化部で標識抗体粒子がhCGあるいはLHを介して結合することによりhCGあるいはLHを測定することを特徴とする測定装置。

【請求項18】 2種類以上のタンパク質測定において、それぞれのタンパク質に特異的に結合するそれぞれタンパク質に対して2種類の抗体を用いて免疫クロマトグラフィ及びサンドイッチ法を利用し、移動相として色の異なった2種類以上の色素を用いて作製した請求項1記載の標識抗体粒子2種類以上を用い、固定相としてそれぞれ一方の抗体を白色の担体に固定化し、2種類以上のタンパク質を含む試料を展開することにより固定化部でそれぞれの標識抗体粒子がそれぞれのタンパク質を介して結合することにより2種類以上のタンパク質を測定することを特徴とする同時測定装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、溶液中の測定対象物を測定あるいは検出する手段として利用することができる、特に環境、食品及び医療の分野に有用な標識抗体粒子およびそれを用いた測定装置に関するものである。

【0002】

【従来の技術】従来の抗体を利用した測定方法あるいは測定装置において、抗体を標識する方法として、色素あるいは酵素を用いるか金属コロイド粒子、ラテックス粒子、染料ゾル粒子あるいは金属酸化物コロイド粒子を用いることが知られていた。

【0003】また、近年盛んに利用されている測定原理として免疫クロマトグラフィ法がある。この免疫クロマトグラフィ法では、標識物として金属コロイドである金コロイドあるいは、ブルーラテックス粒子がよく使用されている。金コロイドは、赤味がかった色をしており、ブルーラテックスは青色をしている。これら測定装置は、簡便性を重視して作製されており、それぞれの標識粒子の色により一般の人でも容易に可視的に検出できるようになっている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】上記のように従来のものは可視的に検出することが重要視されており、その点、色の配色も判定度を向上させるためには重要である。

【0005】従来の方法では、上記以外の粒子を使用してもより鮮やかな色の持った粒子を作製することは困難

であり、また多色を揃えることも困難なことであった。

【0006】さらに酸化物あるいはラテックスに含しんさせる染料の種類を変えることにより色の異なった粒子を作製することは理論的に可能であるが、粒子をコロイド状にし、さらには抗体を容易にその表面に結合させることは困難であった。

【0007】その結果として、種々の測定対象物を同時に測定することもできなかった。

【0008】

【課題を解決するための手段】上記課題を解決する手段として、粒子材料を変更することなく、抗体に結合させる色素の種類を任意に変えて抗体に結合させ、その結合物をさらに粒子に結合する方法または、あらかじめ抗体を粒子に結合させたものに任意の色素を結合する方法を用いることにより、判定度の向上に貢献できる色を持った標識抗体粒子を容易に作製することができる。

【0009】この標識抗体粒子を使用した測定方法及び測定装置は、判定度の向上が期待できる。

【0010】さらには、任意の2種類以上の色素を使用することにより2種類以上の標識抗体粒子を容易に作製することができ、それらを利用することにより種々の測定対象物を同時に測定することもできる。

【0011】

【発明の実施の形態】抗体のアミノ基と結合できる官能基を有しており任意の吸光色を有している色素（蛍光色素）を利用する。一般的な吸光色として橙色（490nm付近）、赤色（550nm付近）、青色（600nm付近）を利用し、それぞれに対応する色素も多く存在している。タンパク質との結合効率の面から官能基としては、サクシミドあるいはイソチオシアネート基が望ましい。

【0012】抗体1分子に対する色素の結合数は、任意に変えることが可能であり、なるべく多く結合させることができる。しかし、多く結合させると抗体の性能（親和性、溶解性等）を低下させる恐れがあるため、結合数は1～20までが望ましい。色素を抗体に結合する際、上記官能基を有する場合には室温で数時間で結合することができる。その後、未反応色素をゲル濾過あるいは透析により容易に取り除くことができる。

【0013】色素標識抗体を結合することのできる粒子（金属コロイド、ラテックス粒子、染料ゾル粒子、金属酸化コロイド等）は多く存在している。測定装置の構成によりどの粒子が最適を選定しなければならない。色素の色調を損なわない粒子が最も適している。その点から、粒子は無色透明あるいはそれに限りなく近いもの、あるいは白色のものを利用する。特に望ましいのは、無色透明な粒子である。通常の方法と同様に粒子と上記色素標識抗体を非特異吸着により結合する。ブロッキング剤としては常法通り牛血清アルブミンを使用する。未反応の色素標識抗体を遠心分離あるいは透析により除去・精製する。

【0014】一つの方法として、最初に抗体を上記方法により選定した粒子に結合させた後、上記色素標識法により色素を標識する。その後、未反応色素を透析あるいは遠心分離により除去・精製する。

【0015】いずれの方法により作製した標識抗体粒子は、その後、安定を保つために凍結乾燥して固体状態で保存するかあるいは測定装置構築のため濾紙に含浸した後に凍結乾燥して保存する。

【0016】色素標識抗体粒子を利用して多くの測定原理と多くの測定対象物の組み合わせが存在する。

【0017】その中でも今回発明した標識抗体粒子を最大限活用できる測定原理は、免疫クロマトグラフィである。この方法は、可視的に（目視で）簡便に測定対象物を検出することができたため、色素標識物である標識抗体粒子を利用する方法としては最適である。

【0018】今回発明した標識抗体粒子を免疫クロマト法に導入することにより多くの測定対象物を測定することができる。特に、免疫測定項目の大多数を占めているタンパク質を半定量的に測定するには、免疫クロマト法とサンドイッチ法を利用することが最も容易な方法であると考えられる。

【0019】サンドイッチ法を導入した免疫クロマトは、測定対象物に対して同時に結合することのできる2種類の抗体が必要であり、一方を標識し移動相として使用し、他方を担体に固定化し固相として使用する。この標識抗体として今回発明した標識抗体粒子を使用する。

【0020】図1に示すように標識抗体粒子含浸濾紙を抗体固定化部の上流側に装着する。さらに上流側から測定対象物を含む試料液を添加し、クロマトにより標識抗体粒子と測定対象物が反応しながら流れる。固定化部まで到達すること測定対象物を介してサンドイッチ状態で標識抗体粒子は停止する。そのため、抗体固定化部が呈色する。

【0021】さらに、この原理を応用して同時に2種類以上の測定対象物を測定することができる。

【0022】この場合、上記の免疫クロマトとの相違点は、標識抗体粒子含浸濾紙中には、2種類以上の色素標識粒子が混在していること、および抗体固定化部は、2カ所以上存在していることである（図1）。

【0023】さらに、具体的に上記発明の一例として、2種類の蛍光色素及び白金コロイドを利用してhCG、LHを同時に測定できる測定装置を用いた測定方法について記述する。

【0024】（TRITC標識抗hCGβ抗体の作製）ETRAMETHYLRHODAMINE-5-(and-6)-ISOTHIOCYANATE (TRITC、Mw=444、吸収極大：約550nm) 1.48mgを100μlのDMFに溶解した（3.33*10⁻⁶mol、抗体比50倍当量）。この液を10mg/ml抗hCGβモノクローナル抗体液（6.67*10⁻⁸mol）に添加し、室温で一晩攪拌しながら反応した。

50 【0025】反応後、SephadexG-25カラム（サイズ：40

5
0*20mm、平衡バッファ：PBS、流速：2ml/分) をかけ、タンパク質分画のみを集めた。

【0026】この分画を紫外線・可視光線スペクル分析を行った結果、抗体1個あたりに10.5個のTRITCが結合していた(抗hCG β -TRITC)。

【0027】(TRITC標識抗hCG β 抗体白金コロイド粒子の作製)

2M K2CO3で白金コロイド溶液のpHを7.0に調節した。250 μ g抗hCG β -TRITCを含む抗体液を100ml白金コロイド溶液に添加した。その後、室温で10分間放置した後、10g/l Carbowax-20M(Union Carbide)と5mM NaClを含む2.0ml溶液(pH 7.0)を添加した。室温で1時間放置した後、遠心分離した(12,000rpm、10分間)。

【0028】沈澱物を10g/l Carbowax-20M(Union Carbide)と5mM NaClと0.1g/l thiomersalを含む2.0ml溶液(pH 7.0)で懸濁した。この操作を2回繰り返した後、最終的に遠心分離後1%BSAを含むPBS2.0mlで懸濁して保存した。

【0029】(FITC標識抗LH β 抗体の作製) LUOR ESCENCEIN-5-ISOTHIOCYANATE (FITC、Mw=389、吸収極大：約500nm) 1.30mgを100 μ lのDMFに溶解した(3.33*10⁻⁶mol、抗体比50倍当量)。

【0030】この液を10mg/ml抗LH β モノクローナル抗体液(6.67*10⁻⁸mol)に添加し、室温で一晩攪拌しながら反応した。

【0031】反応後、SephadexG-25カラム(サイズ：400*20mm、平衡バッファ：PBS、流速：2ml/分)をかけ、タンパク質分画のみを集めた。

【0032】この分画を紫外線・可視光線スペクル分析を行った結果、抗体1個あたりに12個のFITCが結合していた(抗LH β -FITC)。

【0033】(FITC標識抗LH β 抗体白金コロイド粒子の作製)

2M K2CO3で白金コロイド溶液のpHを7.0に調節した。250 μ g抗LH β -FITCを含む抗体液を100ml白金コロイド溶液に添加した。その後、室温で10分間放置した後、10g/

1 Carbowax-20M(Union Carbide)と5mM NaClを含む2.0ml溶液(pH 7.0)を添加した。室温で1時間放置した後、遠心分離した(12,000rpm、10分間)。

【0034】沈澱物を10g/l Carbowax-20M(Union Carbide)と5mM NaClと0.1g/l thiomersalを含む2.0ml溶液(pH 7.0)で懸濁した。この操作を2回繰り返した後、最終的に遠心分離後1%BSAを含むPBS2.0mlで懸濁して保存した。

【0035】(hCG・LH同時測定) ここで作製した抗hCG β -TRITC白金コロイド溶液及び抗LH β -FITC白金コロイド溶液を100 μ lずつ混合した。この混合液をガラス繊維濾紙(ワットマン社製、F075-14、サイズ：50*10mm)に含浸させ、凍結乾燥した。この含浸濾紙を5mm使用して移動相として使用した。

【0036】固定相としては、ニトロセルロース(ミリポア社製、孔径5 μ m、サイズ：16*9mm)に抗hCGポリクローナル抗体及び抗LHポリクローナル抗体それぞれ5mg/mlを1 μ lずつ別の場所に固定化した(図1)。

【0037】一例として、それぞれの濃度のhCG及びLHを使用した(100IU/L~100000IU/L)。

【0038】その後、呈色ラインをデンストメータ(島津製、CS-9000、500・550nmにおける反射吸収度測定)で測定した(図2)。

【0039】

【発明の効果】以上のように本発明は、任意の色を持つ標識抗体粒子及びそれを利用した測定装置及び同時測定装置を得ることができた。

【0040】また、本発明の標識抗体粒子を利用することにより高性能な環境測定装置、食品管理測定装置及び医療診断装置を提供することができる。

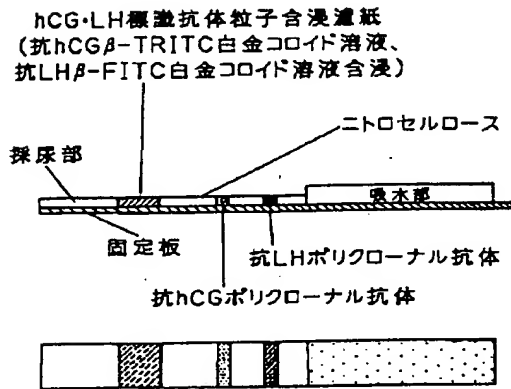
【図面の簡単な説明】

【図1】本発明の標識抗体粒子を用いたhCG、LH同時測定装置の概略図

【図2】本発明の標識抗体粒子を用いたhCG、LH同時測定装置を用いて、hCG、LHを同時に測定した結果を示すグラフ図

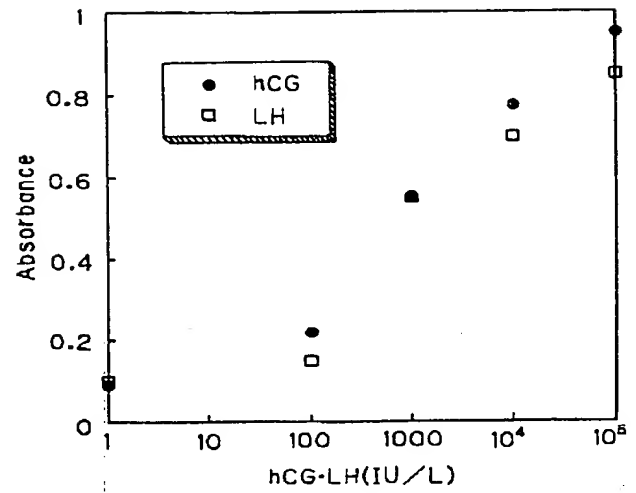
【図1】

hCG・LH測定キット構成図



【図2】

hCG・LH測定キット感度評価図



THIS PAGE BLANK (USPTO)